



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uttryck och lokalisation av tre zinkreglerande proteiner i tarm och hud hos bullterrier med diagnosen letal akrodermatit - en pilotstudie

Heléna Ternestedt

Uppsala

2009

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:9*

Uttryck och lokalisation av tre zinkreglerande proteiner i tarm och hud hos bullterrier med diagnosen letal akrodermatit - en pilotstudie

Heléna Ternestedt

Handledare: Jonas Tallkvist, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Biträdande handledare: Fredrik Södersten, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Examinator: Pia Larsson, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap
Kurskod: EX0234, Nivå X, 30hp

Nyckelord: Letal akrodermatit, acrodermatitis enteropathica, ZIP4, ZnT1, MT, bullterrier

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:9

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	1
Inledning	3
Litteraturöversikt	3
Letal akrodermatit hos bullterrier	3
Vilken funktion har zink?.....	4
Vilka proteiner reglerar zinkhomeostasen?.....	5
ZIP4	5
Funktion	5
Mutationer	5
Lokalisation.....	6
Reglering	6
MT	8
ZnT1	8
Material och metoder.....	9
Djurgrupp	9
Histologisk bearbetning	11
Hematoxylin-eosin-färgning	11
Immunohistokemi	11
Avidin-biotinmetoden	11
MT	12
ZIP4 och ZnT1	13
Metodens styrkor	13
Metodens svagheter	14
Resultat och diskussion	15
ZIP4.....	15
Duodenum.....	15
Hud	16
Hårfolliklar	16
Epidermis.....	16
Talgkörtlar.....	17
Kärlendotel.....	18
Svettkörtlar	18
MT.....	20
Duodenum.....	20
Hud	21
Hårfolliklar	21
Epidermis.....	22
Talgkörtlar.....	23
Kärlendotel.....	23
Svettkörtlar	23
ZnT1.....	25
Duodenum.....	25
Hud	27
Hårfolliklar	27
Epidermis.....	27
Talgkörtlar.....	27
Kärlendotel.....	28
Svettkörtlar	28

Litteraturförteckning.....	30
-----------------------------------	-----------

SAMMANFATTNING

Syftet med studien var att undersöka om letal akrodermatit (LAD) hos bullterrier och acrodermatitis enteropathica (AE) hos människa har etiologiska likheter. Zinkbrist ger vid båda sjukdomarna upphov till bland annat nedsatt tillväxt, dermatit och diarré. Vid AE leder mutationer i ZIP4-genen SLC39A4 till ett nedsatt zinkupptag i tarmen. Vid LAD är orsaken till zinkbristen okänd, även om nedärvningsmönstret ger anledning att misstänka en mutagen bakgrund.

I studien ingick en hund med letal akrodermatit och en kontrollgrupp om fyra hundar. Uttryck och lokalisation av tre proteiner (ZIP4, MT och ZnT1) undersöktes medelst immunohistokemi.

Samtliga individer i kontrollgruppen uppvisade ett högt, apikalt ZIP4-uttryck i duodenums enterocyter. Hunden med akrodermatit uttryckte betydligt mindre ZIP4 i duodenum. Detta skulle kunna betyda att LAD orsakas av mutationer i ZIP4-genen liknande de mutationer som ses vid AE. Andra möjliga orsaker till det låga uttrycket kan dock inte uteslutas. Hunden med LAD skilde sig dessutom från kontrollgruppen genom en markant, apikal ZIP4-ackumulering i svettkörtelpitelet. Denna uppreglering kan tolkas som att huden vid bristtillstånd resorberar zinkjoner från svett.

Hos hunden med akrodermatit sågs ett extremt lågt uttryck av duodenalt MT i jämförelse med kontrollgruppen. Detta är förenligt med ett defekt zinkupptag.

Den apikala lokaliseringen av ZnT1 i duodenum stämde delvis dåligt överens med tidigare studier. Skillnaderna i lokalisation tolkas som att proteinet kan styras till olika delar av cellmembranet. Därigenom kan enterocyternas uttransporterade zink antingen komma kroppen tillgodo eller elimineras via tarmen.

Skillnader i uttryck av ZnT1 påvisades i svettkörtelpitelet. Hos hunden med LAD fanns ZnT1 främst apikalt medan den friska kontrollhunden ackumulerade ZnT1 basalt i cellerna. Den apikala ackumuleringen kan vara normal eller en del av LAD-störningen.

Ytterligare studier krävs för att kontrollera resultatens signifikans.

SUMMARY

The purpose of the study was to assess whether there are etiological similarities between lethal acrodermatitis (LAD) in English Bull Terrier dogs and acrodermatitis enteropathica (AE) in man. In both diseases zinc deficiency manifests itself through symptoms like stunted growth, dermatitis and diarrhea. In AE the deficiency results from insufficient uptake of zinc by the intestine due to mutations in the ZIP4 gene SLC39A4. In LAD the reason for the deficiency is unknown, although the inheritance pattern suggests a mutational etiology.

The study included one dog diagnosed with LAD and a control group of four dogs. The expression and localization of three proteins (ZIP4, MT and ZnT1) were determined by immunohistochemical methods. All control dogs expressed high levels of apical ZIP4 in duodenal enterocytes. In the LAD dog duodenal ZIP4 was conspicuously less abundant. These results suggest that LAD patients

could suffer from mutations in the ZIP4 gene similar to the mutations seen in AE. Other possible explanations for the low expression should be sought. The dog with LAD also differed from the control group by its marked apical ZIP4 expression in the sweat gland epithelium. This upregulation may be due to a need for zinc resorption from sweat in the zinc-deficient dog.

The LAD dog expressed extremely low levels of duodenal MT compared to the control dogs. These results are consistent with an insufficient zinc uptake.

The apical localization of duodenal ZnT1 was somewhat inconsistent with previous data. The inconsistency can be interpreted as an ability of the enterocyte to direct the protein to different parts of the plasma membrane. By doing so, zinc can either be directed to the blood stream or to the intestinal lumen for elimination.

In the LAD dog the sweat gland ZnT1 accumulation was apically oriented while it was basally oriented in the control dog. The apical localization of the protein may be normal or part of the LAD disorder.

Further studies are needed to confirm these findings.

INLEDNING

Acrodermatitis enteropathica (AE) är en sällsynt men allvarlig, genetiskt betingad sjukdom som drabbar människa. Drabbade individer har en mutation i en gen som kodar för ett av de proteiner som reglerar zinkupptaget från tarmen. Hos hundrasen bullterrier (engelsk typ) förekommer sporadiskt en autosomalt recessiv sjukdom som, baserat på symptombild och arvsång, liknar acrodermatitis enteropathica. Sjukdomen går idag under benämningen letal akrodermatit (LAD).

Humanfall behandlas framgångsrikt med zinktillskott i peroral eller parenteral form. Zinkterapi är dock otillräckligt för att stävja akrodermatit hos bullterrier. Sjukdomen har hos hund därför alltid dödlig utgång. Det är till dags dato okänt varför hundarnas förmåga att ta upp zink är nedsatt.

De senaste tio åren har flera vetenskapliga framsteg gjorts kring zinkmetabolismen. Huvuddelen av forskningen kring AE är utförd på mus, råtta och människa. Syftet med denna pilotstudie är att med hjälp av immunohistokemiska analysmetoder studera uttryck och cellulär lokalisation av zinc and iron regulated protein 4 (ZIP4), zinc transporter 1 (ZnT1) och metallothionein (MT) i tunntarm och hud hos hundar med och utan letal akrodermatit. Hypotesen är att etiologin bakom letal akrodermatit hos bullterrier liknar eller är densamma som för acrodermatitis enteropathica hos människa.

Den immunohistokemiska analysen inleds i studien genom att omärkta primära antikroppar får reagera med det protein man vill studera, i det här fallet ZIP4, ZnT1 och MT. Dessa antikroppar är framtagna för att specifikt binda till de proteiner som ska studeras. Sekundära antikroppar tillförs sedan för att i sin tur binda till de primära antikropparna. De sekundära antikropparna är biotinylerade. I nästa steg fäster ett avidin-biotin-peroxidas-komplex in där biotinylerade antikroppar finns. Peroxidas är ett enzym som vid tillsats av 3,3'-diaminobenzidine ger en brun infärgning där antikropparna fäster in, dvs. där proteinet man vill undersöka är lokaliserat. Immunohistokemiskt preparerad vävnad från hunden med akrodermatit jämförs sedan med motsvarande vävnad från friska artfränder.

LITTERATURÖVERSIKT

Letal akrodermatit hos bullterrier

Letal akrodermatit (LAD) är en ovanlig sjukdom som uppträder hos engelsk bullterrier. LAD medför att den drabbade individen inte kan tillgodogöra sig zink på ett normalt sätt. Zinkbristen ger allvarliga konsekvenser i form av nedsatt tillväxt, progressiv akrodermatit med inflammation i anslutning till klofalsar, spretande tår, nedsatt motståndskraft mot infektiösa agens med följder som diarré, bronkopneumoni och kronisk pyodermi, dilatation av cerebrala ventriklar och onormalt beteende i form av exempelvis aggressivitet. Sjukdomen har en autosomal recessiv arvsång (Jezyk et al, 1986; McEwan et al, 2000).

Vid försök att behandla drabbade hundar med höga perorala zinkdoser har man endast sett små förbättringar i symptombild och lymfocytär mitogenicitet. Intraperitoneala injektioner leder till granulomatös peritonit med tarmobstruktiva följder. Intravenös giva har visat sig ge upphov till vaskulit (Jezyk et al, 1986).

Hudförändringar ses framförallt i ansikte och på tassar. Hos hundar äldre än 6 månader ses en allvarligare inflammation kring klofalsar, patologiska förändringar i klor och hyperkeratotiska trampdynor. Hudbiopsier som visar på kraftig parakeratotisk hyperkeratos talar för diagnosen om andra typiska kliniska symptom ses (McEwan et al, 2000). Medellivslängden är drygt 7 månader (Jezyk et al, 1986).

Neutrofili, lågt ALP och ALAT och i flera fall hyperkolesterolemi tillhör sjukdomsbilden liksom en defekt T- och B-lymfocytfunktion (Jezyk et al, 1986). Thymopoetin är ett hormon som reglerar utmognaden av T-lymfocyter. Enligt Prasad (1985) är thymopoetin beroende av att zink finns tillgängligt. McEwan et al visade 2003 att bullterriers med akrodermatit uppvisar normala IgG- och IgM-nivåer men att IgA-nivåerna är signifikant lägre än hos friska individer.

Man har i åtminstone två studier sett att drabbade individer kan uppvisa sänkta plasmazinkkoncentrationer (Jezyk et al, 1986; Uchida et al, 1997). Enligt andra källor bör man dock inte lita till blodets serumzinknivåer utan basera diagnosen på raspredilektion och symptombild (McEwan et al, 2000). Blodets zinknivåer kan sjunka vid inflammatoriska tillstånd. Man tror att nivåerna sjunker delvis på grund av uppreglering av ZIP14 i levern (försök på mus). Sänkta plasma- eller serumzinknivåer behöver alltså inte vara liktydigt med zinkbrist. Man vet dessutom att människor med zinkbristdermatit svarar på zinkterapi trots att blodets zinknivåer är normala. Blodets zinkkoncentrationer hålls normalt inom ett mycket snävt intervall. Plasmazink utgör endast 0,1 % av kroppens totala zinkreserver. Hos människa finns 85 % av kroppens zinkreserver i skelettmuskel och ben. Det är alltså svårt att på ett enkelt sätt mäta kroppens sanna zinkstatus (Maverakis et al, 2007).

Vilken funktion har zink?

Zink krävs för proteinsyntes, DNA-syntes, celldelning och celldifferentiering. Zink behövs även för att immunsvaret, reproduktion och skydd mot fria radikaler ska fungera normalt samt fungerar som en mediator i intracellulära reaktionsvägar och som co-faktor för en rad enzymer och transkriptionsfaktorer (Chimienti et al, 2003, Prasad, 1985; Maverakis et al, 2007; Laity och Andrews, 2007). Exempelvis binder zink till transkriptionsfaktorerna metal response element transcription factor (MTF) och zinc finger transcription factor Krüppel-like factor 4 (KLF4) som i sin tur reglerar uttrycket av vissa zinktransporterande proteiner. MTF reglerar bland annat ZnT1 och metallothionein (Langmade et al, 2000; Maverakis et al, 2007) medan KLF4 reglerar transkriptionen av ZIP4 (Lichten och Cousins, 2009).

Vid zinkbrist ses bland annat nedsatt tillväxt och sänkt immunförsvar (Murakami et al, 2008). Zinkbrist leder till apoptos hos många celltyper medan alltför höga zinknivåer medför oxidativ stress och lysering av cellerna. Proteinerna MT och ZnT1 motverkar höga intracellulära zinkhalter på olika sätt. MT binder upp intracellulärt zink medan ZnT1 transporterar zink ut ur cellen (Chimienti et al, 2003). Vanliga bieffekter vid peroralt zinktillskott är hos människa irritation i magsäcken med illamående, kräkningar och magsår. Överdoserings kan ge fatal svikt i flera olika organsystem (studier på människa) (Maverakis et al, 2007).

Vilka proteiner reglerar zinkhomeostasen?

Zink absorberas framförallt i tunntarmen, och då särskilt i jejunum. Njuren resorberar effektivt filtrerat zink medan de största förlusterna görs genom utsöndringar från pancreas via tarmen. Kroppen förlorar dessutom zink genom att epitelceller lossnar samt genom mjölk, svett, sperma, håravfall och menstruation (Maverakis et al, 2007).

För att zink ska transporteras över cellmembranet krävs en solute-linked carrier (SLC). De transportörer som förändrar den intracellulära zinkkoncentrationen kan delas in i två proteinfamiljer – ZnT (SLC30) och ZIP (SLC39) (Liuzzi et al, 2004). ZnT-familjen bidrar till att sänka zinkkoncentrationen i cytoplasman medan ZIP-familjen verkar i motsatt riktning (Lichten och Cousins, 2009).

ZnT-familjen sänker zinkkoncentrationen dels genom att transportera in metalljonerna i cellorganellers lumina och dels genom att transportera ut zink ur cellen för vidare transport via blodomloppet. I blodet binder zinkjonerna till albumin (Lichten och Cousins, 2009; Maverakis et al, 2007).

ZIP-proteiner flyttar istället zink från organellerna till cytoplasman. Dessutom transporterar de extracellulära zinkjoner in i cellen (Lichten och Cousins, 2009).

En tredje proteingrupp som är viktig i sammanhanget är metallothionein som skyddar cellen mot toxiska zinknivåer genom att binda överskottszink (Mao et al, 2007).

ZIP4

Funktion

ZIP4 är ett protein som transporterar zink från tarmlumen och in i enterocyterna. Den exakta mekanismen för hur ZIP4 transporterar zink är idag okänd (Andrews, 2008). Humant ZIP4 (hZIP4) har en histidinrik del som tros vara lokaliserad apikalt på cellmembranets utsida i tarmen. Eventuellt kan det vara denna specifika del som fångar upp zink från tarmlumen (Wang et al, 2002).

Mutationer

Acrodermatitis enteropathica är en ovanlig sjukdom som medför ett otillräckligt zinkupptag till följd av mutationer i genen SLC39A4. Detta är visat hos människa (Maverakis et al, 2007). SLC39A4 kodar för proteinet ZIP4 som är essentiellt för normal zinkhomeostas (Kambe och Andrews, 2009). Merparten av forskningen kring ZIP4 är utförd på människa, mus och råtta. ZIP4 är ett välkonserverat protein. Musens och människans ZIP4 är homologa till 76 % (Dufner-Beattie et al, 2003).

Hos människa har ett flertal mutationer kunnat kopplas till sjukdomen. Wang et al lokaliserade år 2001 AE-genen hos människa till ett begränsat område på kromosomregionen 8q24.3 och fann att flera av de drabbade individerna var homozygota för en viss grupp av alleler i området. Året därpå påvisade Wang et al åtta missensemutationer, en splicing defect och en uppströms transkriptionsinaktiverande deletion i genen SLC39A4 i kromosomregionen 8q24.3 hos patienter med AE.

Även om genen för hZIP4 är muterad förmår människor med AE ta upp tillräckligt med zink förutsatt att perorala tillskott ges. Detta tyder på att det finns andra funktionella mekanismer för zinkabsorption (Wang et al, 2002). Wang et al diskuterar möjligheten att SLC39A4-mutationerna försämrar hZIP4-funktionen utan att helt slå ut proteinets funktion. Wang et al (2002) diskuterar även mutationer i andra sekvenser som förklaring till de humanfall där 8q24.3-kromosomregionen föreföll opåverkad.

I studier på ZIP4-transfekterade celler har man bland annat funnit att AE-mutationer påverkar proteinets funktion, dels genom att det hålls kvar i det endoplasmatiska nätverket och dels genom att dess zinkupptagande förmåga minskar (Wang et al, 2004). När zinkbrist råder sker normalt sett en klyvning (proteolys) av en extracellulär del av ZIP4. Vissa AE-mutationer kan blockera eller försvåra en sådan klyvning (Kambe och Andrews, 2009).

Wang et al studerade 2003 hur sex humana AE-associerade missense-mutationer påverkade zinkupptaget hos mus in vitro. Samtliga mutationer ledde till ett minskat zinkupptag. Man såg två fenotypiska tendenser. Fyra av de sex mutationerna ledde till att murint ZIP4 (mZIP4) i lägre utsträckning än normalt nådde önskad lokalisation vid cellytan. Hos dessa proteiner sågs ofullständig N-glykosylering. Glykosylering av proteiner sker i endoplasmatiska retiklet (ER) och bidrar bland annat till att proteiner så småningom hamnar på rätt plats i cellen (Alberts et al, 2004). Mutationer i två andra alleler gav normala till höga nivåer av mZIP4 vid cellmembranet, dock var zinkupptagshastigheten hos dessa proteiner kraftigt sänkt (ca 30 % av hastigheten hos möss med normal genuppsättning). En av dessa mutationer (G539R) gav upphov till ändrade laddningsförhållanden, och man spekulerade därför i om den förvärvade positiva laddningen hos den aktuella transmembrandomänen kunde bidra till att positivt laddade, extracellulära zinkjoner stöttes bort (Wang et al, 2003).

En av de mutationer som ledde till minskad ackumulering av ZIP4 vid cellens yta (G643R) resulterade i total förlust av detekterbar zinkupptagningsförmåga. Trots detta kan humanpatienter med mutationen behandlas framgångsrikt med perorala zinktillskott. Det är okänt hur zinkupptaget sker i dessa fall (Wang et al, 2003).

Lokalisation

Det kraftigaste uttrycket av ZIP4 ses hos människa i magsäck, tunntarm, grovtarm och njure. Ett starkt uttryck ses även i musenterocyter (Wang et al, 2002). ZIP4 är inte detekterbart i tarmen när zinkkoncentrationerna i födan är normalhöga. När zinkbrist uppstår ses dock en dramatisk ackumulering vid cellens apikala yta (Kambe och Andrews, 2009). ZIP4-proteinet finns både i mogna enterocyter och nere i tarmkryptorna, men det verkar som att förändringarna i lokalisation och ackumulering vid det apikala cellmembranet bara sker i de mogna enterocyterna, det vill säga inte i kryptorna (Liuzzi et al, 2004).

Reglering

Uttrycket av ZIP4 regleras både utifrån tarmlumens zinkkoncentrationer och utifrån systemiska zinkkoncentrationer (Dufner-Beattie et al, 2003; Liuzzi et al, 2004; Dalton et al, 1997). Vid lågt zinkintag ses ett markant ökat uttryck och en

ökad apikal koncentration av ZIP4 i enterocyterna hos mus (Dufner-Beattie et al, 2003; Liuzzi et al, 2004; Liuzzi et al, 2009).

Regleringen sker dels genom transkriptionsrelaterade mekanismer och dels genom mekanismer som följer efter transkription. Zinktillgången i tarmen avgör hur mycket ZIP4-mRNA som finns samt cellulär lokalisation och omsättning av proteinet. Ökat uttryck av ZIP4 ses vid lågt zinkinnehåll i dieten. Det ökade uttrycket förklaras dels av att befintligt ZIP4-mRNA stabiliseras och dels av att zinc finger transcription factor Krüppel-like factor 4 (KLF4) bidrar till att transkriptionen av ZIP4-mRNA uppregleras (Lichten och Cousins, 2009). En zinkfattig diet leder till förhöjda nivåer av KLF4 i tarmepitelceller. Om funktionellt KLF4 saknas dämpas ZIP4-induktionen vid zinkbrist. KLF4 binder till ZIP4-promotorn. Denna bindning ökar då zinktillgången är begränsad (studier på mus, Liuzzi et al, 2009).

Uppregleringen av ZIP4 hämmas hos metallothionein-knockoutmöss vilket kan tyda på att intracellulära zinkreserver också spelar in. I samband med att ZIP4 uppregleras ses normalt ett minskat uttryck av metallothionein. Därför kan de låga ZIP4-nivåerna hos MT-knockout-möss verka förbryllande. En förklaring skulle kunna vara att metallothionein, som ju binder zink, kan ge feedback så att ZIP4 uppregleras vid behov. MT-knockoutmöss skulle således inte skicka någon signal om uppreglering (Liuzzi et al, 2004).

När zink tillförs per os har man sett att ZIP4-mRNA destabiliseras och att apikalt ZIP4 genomgår endocytos för att därefter degraderas (Weaver et al, 2007; Kim et al, 2004; Mao et al, 2007). Kim et al (2004) har även funnit tecken på att proteinet växlar mellan att befinna sig i cellmembranet och i perinukleära cytoplasmatiska vesikler.

ZIP4 regleras genom flera posttranskriptionella mekanismer (degradering, endocytos, förändringar i mRNA-stabilitet). När de tillgängliga zinknivåerna är låga produceras mer ZIP4 som sedan transporteras ut till cellytan. När zinknivåerna åter normaliseras eller blir högre än normalt tas ZIP4 åter in i cytoplasman för degradering. Det mesta talar för att ZIP4 kan ta upp zink från den extracellulära miljön på ett effektivt sätt när zinknivåerna är mycket låga men att ZIP4 är överflödigt eller till och med skadligt vid normala zinknivåer (Kambe och Andrews, 2009).

Mao et al (2007) har undersökt en typ av hZIP4-reglering som involverar uppmärkning av proteinet för degradering vid förhöjda zinknivåer. Denna ubiquitinmedierade degradering av ZIP4 är nödvändig för att cellerna ska skyddas från alltför höga zinknivåer. Det är en cytoplasmatisk, histidinrik domän hos ZIP4 som möjliggör att proteinet kan märkas upp för degradering. Genom att ZIP4 degraderas vid höga zinknivåer minskar risken för zinktoxicitet. Högre zinknivåer krävs för att ZIP4 ska degraderas än för att proteinet ska genomgå endocytos.

Ubiquitinmärkning är ett komplement till zinkstimulerad endocytos och reglering via mRNA. Endocytosen tycks regleras av tarmens zinkkoncentrationer medan regleringen via mRNA åtminstone delvis styrs av systemiska eller cytoplasmatiska zinknivåer (Mao et al, 2007). Dufner-Beattie et al visade 2003 på mus att oral eller parenteral zinkgiva ledde till att mZIP4 försvann från den

apikala ytan hos enterocyterna. Kim et al visade 2004 att detta åtminstone delvis beror på snabb endocytos.

Ektodomänen hos ZIP4 utgör drygt hälften av proteinet. Ektodomänen avlägsnas genom proteolys vid långvarig zinkbrist och tas sedan in i cellen genom endocytos. Den kvarstående delen av proteinet ackumuleras vid cellmembranet i riklig mängd. I celler med muterat SLC39A4 ackumuleras även ektodomänen under zinkfattiga förhållanden. Ektodomänen förblir alltså associerad till cellmembranet under dessa förhållanden. Klyvningen av ektodomänen kan ha en central roll för ZIP4-funktionen och zinkhomeostasen. Klyvningen verkar initieras av mycket låga zinkkoncentrationer. Det skulle kunna vara så att ektodomänen fungerar som en zinksensor (studier på mus, Kambe och Andrews, 2009).

MT

Metallothioneiner (MT) förekommer ubikvitärt i kroppen. De vanligaste isoformerna går under namnen MT-1 och MT-2 (Coyle et al, 2002). Metallothioneiner är cysteinrika proteiner i cellens cytoplasma. De har bland annat till uppgift att binda överskottszink och skyddar därmed cellen mot toxicitet (Sato och Kondoh, 2002; Mao et al, 2007; Laity och Andrews, 2007).

Cellulär ackumulering av metallothionein regleras genom genuttryck och proteindegradering (Davies och Cousins, 2000). Metal-responsive element-binding transcription factor-1 (MTF-1) känner av zinknivåerna i cellen och koordinerar därefter uttrycket av bland annat MT och ZnT1. MTF-1 har en zinkbindande domän. När zink binder till denna domän translokerar MTF-1 till kärnan för att stimulera MT- och ZnT1-generna till ökad transkription. MT har hög affinitet för zink och binder således överskottszink medan ZnT1 transporterar ut zink ur cellen (Langmade et al, 2000; Andrews, 2001). Ungefär samma zinkkoncentrationer krävs för att ZIP4 ska genomgå degradering som för att metallothionein ska induceras via MTF-1 (Mao et al, 2007). MT-syntes sker som svar på många olika stimuli (kadmium, kvicksilver, zink, oxidativ stress, glukokortikoider, inflammation m.m.) (Sato och Kondoh, 2002; Inoue et al, 2005).

Födans zinknivåer påverkar hur höga MT-koncentrationer som så småningom ses i vävnaderna. Olika zinkhalter i födan påverkar lokaliseringen och koncentrationen av MT i tarmen (försök på växande råttor). En zinkfattig diet leder till att MT inte uttrycks i tunntarmen. Ett starkt uttryck av MT, framförallt i Paneth-celler och ytepitelceller i de proliferativa delarna av villi, ses däremot när kosten varit zinkberikad. Låg zinktilförsel leder till en signifikant lägre koncentration av MT i enterocyterna i jämförelse med råttor med obegränsad tillgång till föda med normala zinkkoncentrationer. Den intracellulära zinkkoncentrationen är dock jämförbar hos de bägge grupperna (Szczurek et al, 2001).

ZnT1

ZnT1 finns i kroppens alla vävnader men uttrycks i högre omfattning i bland annat tunntarm (McMahon och Cousins, 1998; Liuzzi et al, 2001). McMahon och Cousins undersökte år 1998 duodenum och jejunum hos växande hanråttor och såg i samband med detta att tarmens ZnT1 finns i rikligast mängd basolateralt i de

enterocyter som linjerar villi. I studien studerades proteinets lokalisering med hjälp av immunofluorescens.

ZnT1 har som uppgift att transportera ut zink ur cellen (Liuzzi et al, 2004). Uttrycket av ZnT1 påverkas av det dietära zinkintaget. När odlade celler utsätts för ökade zinkkoncentrationer induceras ZnT1-mRNA snabbt (inom 3 h) och kraftigt (en tolvfaldig ökning) i cellerna. Cellerna vars odlingsmedium utsätts för chelerande behandling uppvisar sänkta ZnT1-mRNA-nivåer (Langmade et al, 2000). Råttor som utfodras med zinkfattigt foder uppvisar ett lägre uttryck av ZnT1-mRNA. En nedreglering sker inte bara i tarmen utan även i pancreas (Liuzzi et al, 2004). Vid utfodring med zinkrikt foder ses en ökning av ZnT1-mRNA hos råttor, framförallt i tunntarm, lever och njurar. En mindre uppreglering sker även i fettvävnad, lever, mjälte och thymus (Liuzzi et al, 2001).

Enligt Liuzzi et al (2001) leder en zinkrik kost till uppreglering av både ZnT1-mRNA och metallothionein-mRNA (studier på råttor). MTF-1 känner av zinknivåerna i cellen och koordinerar uttrycket av både MT och ZnT1 (Andrews, 2001).

MATERIAL OCH METODER

Litteraturoversikten är sammanställd efter befintlig litteratur och vetenskapliga publikationer. Det laborativa arbetet är av retrospektiv karaktär. I studien användes utvalt biopsi- och obduktionsmaterial arkiverat vid institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU.

Djurgrupp

I denna studie ingick fem hundar (tabell 1). Vävnad från magtarmkanal respektive hud undersöktes. Ingen av hundarna uppvisade några patologiska förändringar i duodenum. Däremot sågs i flera fall histologiska avvikelser i ventrikel och colon. Denna studie fokuserar därför på eventuella fynd kopplade till duodenum respektive hud.

Två av hundarna, hund A och B, obducerades vid institutionen för patologi, SLU, under hösten 2007. I samband med obduktionerna skars vävnad från tarm och hud ut för att sedan fixeras i formalin. Övrigt undersökt material, dvs från hund C-E, utgjordes av inskickade tarmbiopsier.

Hund A (bullterrier, hane) hade den kliniska och patologianatomiska diagnosen letal akrodermatit (LAD). Hund B-E utgjorde studiens kontrollgrupp. I kontrollgruppen ingick två bullterrierhundar (en tik och en hane), en cavalier king charles spaniel (hane) och en shetland sheepdog (hane). Ingen av hundarna i kontrollgruppen uppvisade tecken på LAD. Kontrollgruppen var dessutom fri från patologiska förändringar i duodenum och i förekommande fall kutana vävnader. Samtliga hundar var yngre än 3 år.

Tabell 1. Sammanställning över de hundar som ingick i studien

	Ras	Kön	Ålder	Undersökt material	Patologananatomisk diagnos enligt journal
Hund A	Bullterrier	Hane	6 månader	Obduktionsmaterial. Ventrikel, duodenum, hud.	Multifokal kraftig parakeratotisk hyperkeratos med pustler, serocellulära krustor och en mild till måttlig ytlig dermal inflammation, förändringar förenliga med akrodermatit.
Hund B	Bullterrier	Tik	2 år och 8 månader	Obduktionsmaterial. Ventrikel, colon, hud.	Kronisk nefrit.
Hund C	Bullterrier	Hane	6 månader	Biopsier från ventrikel och duodenum.	Kronisk ospecifik gastrit, lindrig.
Hund D	Cavalier King Charles Spaniel	Hane	1 år och 9 månader	Biopsier från duodenum.	Mild segmentell ospecifik kronisk colit, mild till minimal ospecifik kronisk gastrit.
Hund E	Shetland Sheepdog	Hane	1 år och 9 månader	Biopsier från ventrikel, duodenum och colon.	Kronisk mild ospecifik gastrit.

Histologisk bearbetning

Formalinfixerade, paraffinbäddade vävnadsprover från magtarmkanal och hud snittades i 4 till 6 μm tunna skivor och monterades sedan på objektglas varefter hematoxylin-eosin-färgning respektive immunhistokemi utfördes.

Hematoxylin-eosin-färgning

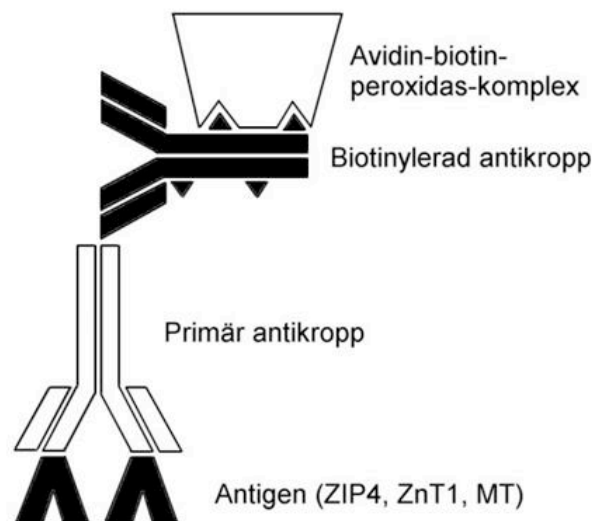
Hematoxylin-eosin-färgade snitt användes i första hand som referens vid bedömning av den immunohistokemiska infärgningens grad och lokalisation.

Immunohistokemi

Immunohistokemi utfördes enligt avidin-biotin-metoden (Preformed avidin-biotin-enzyme complex (ABC)). Protokollet hämtades från "Handbook of immunochemical staining methods" (1989).

Avidin-biotinmetoden

Metoden går i korthet ut på att man till vävnaden först tillsätter en primär antikropp som är riktad mot det protein som ska studeras. Därefter låter man en biotinylerad sekundär antikropp binda till den primära antikroppen. Biotinylering är en skonsam process i vilken biotin binder kovalent till antikroppen. Avidin-biotin-peroxidas-komplex tillförs sedan och tack vare avidinets höga affinitet för biotin fäster komplexet in där biotinylerade antikroppar finns (fig 1).



Figur 1. Principen för påvisande av proteiner genom immunohistokemi. (Modifierad efter Naish et al, 1989).

MT

Efter snittning avparaffinerades preparaten med Xylen. Därefter hydrerades snitten genom en alkoholserie med sjunkande koncentration (absolut etanol, absolut etanol, 96 % etanol, 70 % etanol).

Efter sköljning i Tris Buffered Saline (TBS) följde antigen retrieval i citratbuffert (10mM Sodiumcitrat, 0,05% Tween 20, pH 6,0) i vattenbad 98° C i 20 minuter. Antigen retrieval ger en bättre exponering av antigen och därmed bättre förutsättningar för att antikroppar ska fästa in.

Efter antigen retrieval sköljdes preparaten åter i TBS. För att neutralisera endogent peroxidas inkuberades glasen sedan med 0,03 % väteperoxid i 30 minuter och sköljdes därefter åter i TBS.

Blockering utfördes med 10 % getserum i 30 minuter. Blockering med getserum minskar risken för att antikroppsaggregat av den primära och sekundära antikroppen ska binda till vävnadens Fc-receptorer. Man minskar också risken för att de sekundära antikropparna ska korsreagera med endogena immunoglobuliner i vävnaden.

Preparaten inkuberades sedan över natt i kylskåp med primär antikropp (Monoclonal Mouse Anti-Horse Metallothionein 1:50, clone E9¹, IgG1 Horse self-polymerized MT-1 och MT-2 från DakoCytomation) respektive negativ kontroll (Mouse IgG1 Negative Control från DakoCytomation). IgG1 späddes med TBS till samma koncentration som den primära antikroppen.

Preparaten sköljdes i TBS och inkuberades därefter med sekundär antikropp (Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/Biotinylated från Dako, 1:200) i 30 minuter. Efter detta steg sköljdes glasen i TBS.

Preparaten inkuberades med AB-komplex i 30 minuter (Vectastain från Vector laboratories. Avidin/biotin blocking kit. Rabbit IgG.) och sköljdes därefter i TBS.

Preparaten framkallades i 3,3'-diaminobenzidine (DAB) tills brunt omslag sågs (drygt 10 minuter) och sköljdes därefter i kranvatten.

Motfärgning av preparaten skedde genom nedsänkning i Mayers hematoxylin i 25 sekunder. Därefter blånades de i kranvatten i 15 minuter

Preparaten dehydrerades genom en alkoholserie med stegrande koncentration enligt följande: 70 % etanol, 95 % etanol, absolut etanol (tre bad). Preparaten behandlades därefter med Xylen i fyra steg inför montering.

ZIP4 och ZnT1

Avparaffinering och hydrering utfördes enligt tidigare beskrivning. Därefter sköljdes preparaten i Phosphate Buffered Saline (PBS). Efter antigen retrieval (se tidigare beskrivning) sköljdes preparaten på nytt i PBS.

Blockering av endogena peroxidaser utfördes med 100 % metanol i 30 minuter. Snitten sköljdes sedan noggrant i destillerat vatten.

10 % getserum (Normal Goat Serum från Vector Labs) användes för blockering av ospecifik bindning (30 minuter). Getserumet skakades sedan av och överflödigt serum runt snitten torkades av.

De primära, polyklonala antikropparna (ZIP4 och ZnT1) späddes till koncentrationen 1:1000 respektive 1:2000 i 0,1 % NGS (spädd med PBS). Preparaten inkuberades sedan med respektive primär antikropp över natt i kylskåp.

Morgonen därpå sköljdes preparaten med PBS, varefter sekundär antikropp applicerades (Goat antirabbit IgG från Vector labs, spädd 1:200 i PBS). Därefter inkuberades preparaten i rumstemperatur i en timme.

Efter sköljning i PBS applicerades AB-komplex från Vector labs och snitten inkuberades i 30 minuter.

Preparaten sköljdes åter i PBS och framkallades därefter med DAB tills färgomslag sågs. DAB-färgningen avbröts genom sköljning i kranvatten.

Motfärgning med hematoxylin, dehydrering och montering skedde sedan enligt tidigare beskriven metod.

Metodens styrkor

Antikropparna som används i studien är framtagna för att specifikt binda till de proteiner som studeras (ZIP4, MT och ZnT1). Samtliga antikroppar är riktade mot högt konserverade regioner mellan olika species (människa, råtta, mus, gris). Dessa specifika antikroppar har inte tidigare använts vid immunohistokemi på djurslaget hund. Sannolikheten är dock hög att de konserverade regionerna på proteinerna är lika hos alla däggdjur.

En positiv kontroll och en negativ kontroll ingår i varje analys. När det gäller ZIP4 och MT utförs kontrollen på duodenal vävnad från gris. För ZnT1 används kontrollvävnad (duodenum) från mus. ZIP4 har tidigare undersökts på musduodenum och visats fungera. MT har tidigare undersökts på både mus- och grisduodenum och visats fungera. ZnT-1 har tidigare undersökts på rått- och musduodenum samt humana intestinala epitelceller (Caco-2) odlade in vitro och visats fungera.

Den positiva kontrollen behandlas exakt som vävnaden från hundgruppen. Genom detta förfarande kontrolleras att analysen fungerat problemfritt. Till den negativa kontrollen för ZIP4 och ZnT1 tillsätts inga primära antikroppar, varpå man kontrollerar att de sekundära antikropparna inte binder till något ospecifikt ställe. Härigenom kontrolleras alltså antikropparnas specificitet. Till utvalda dublettglas i

analysen av MT har de primära antikropparna medvetet ersatts med IgG1. I övrigt är den behandling dublettglas och övriga glas genomgår identisk. Detta är också en typ av negativ kontroll. I samtliga analyser var den negativa kontrollen negativ vid framkallning med DAB.

Blockering med getserum minskar risken för ospecifik infärgning, dels genom att antikroppsaggregaten ej tillåts binda till vävnadens Fc-receptorer och dels genom att förhindra att de sekundära antikropparna korsreagerar med endogena immunoglobuliner i vävnaden.

Metodens svagheter

Det begränsade djurmaterialet och den bristfälliga standardiseringen medför att tolkningen av resultaten måste ske med försiktighet. Syftet var att se om metoden överhuvudtaget är applicerbar på djurslaget hund samt att bedöma om några uppenbara skillnader kunde observeras mellan hundarna.

Mer omfattande studier krävs där man jämför fler individer, standardiserar hundarnas zinkintag och reglerar tidpunkten för biopsring. En standardisering i fråga om var hud- respektive tarmbiopsier tas vore önskvärd. Kontrollgruppen bör också vara helt fri från störningar i magtarmkanalen, vilket inte var fallet här. Vi vet idag inte hur exempelvis inflammatoriska förändringar påverkar uttrycket av de studerade proteinerna.

Lindrig till måttlig autolys i hud respektive colon försvårade tolkningen gällande en av kontrollhundarna (obduktionsmaterial). Optimalt är förstås att välja kontrollmaterial från hundar med minimala kadaverösa förändringar.

Vid analysen av ZIP4 och ZnT1 var de primära antikropparna av polyklonal typ. Vid MT-analysen nyttjades istället monoklonala primära antikroppar. Polyklonala antikroppar är riktade mot fler epitoper än monoklonala antikroppar. Polyklonala antikroppar är mindre specifika än monoklonala antikroppar, varför monoklonala antikroppar ofta är att föredra. För att i möjligaste mån undvika ospecifik infärgning har blockering utförts. En liten risk kvarstår dock att de polyklonala antikropparna kan reagera med andra molekylers epitoper (s.k. korsreaktion) vilket i nästa steg kan ge upphov till felaktiga tolkningar av resultaten.

RESULTAT OCH DISKUSSION

Laborationen visade att hundar som väntat uttrycker ZIP4, metallothionein och ZnT1 i ett flertal celltyper och vävnader. Resultaten specificeras nedan.

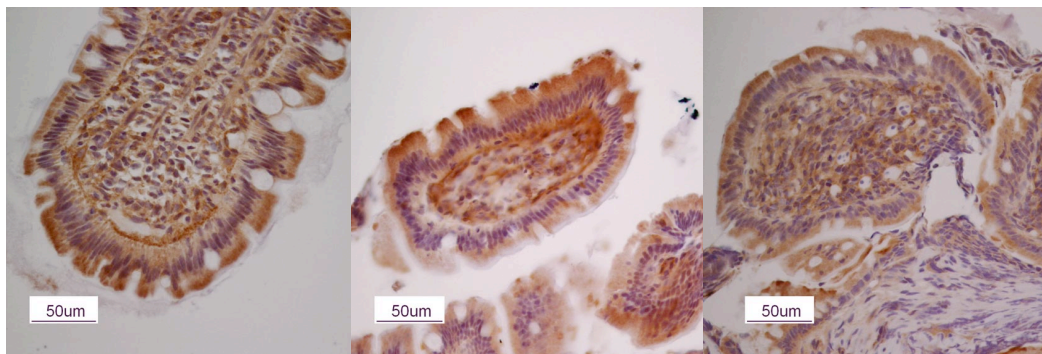
ZIP4

ZIP4 uttrycktes i ventrikelns funduskörtlar (parietalceller och huvudceller), i pylorus mukösa halsceller, i pyloruskörtlar samt i enterocyterna i duodenum och colon (jejunum ej undersökt). I enterocyterna sågs en gradient med starkast koncentration apikalt, det vill säga mot tarmlumen. Den apikala lokaliseringen överensstämmer väl med tidigare studier på andra djurslag.

I huden påvisades uttryck av ZIP4 i skivepitel, talgkörtelceller, svettkörtelceller, kärlendotel samt hårfolliklar.

Duodenum

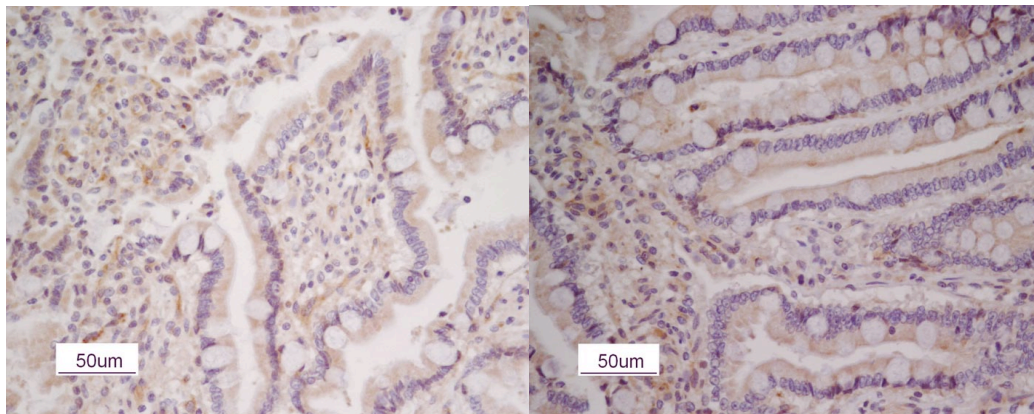
Hos kontrollhundarna sågs en tydlig ZIP4-gradient i enterocyterna med det kraftigaste uttrycket apikalt i cellerna (fig 2). Uttrycket varierade från medelstarkt till mycket kraftigt. Vissa celler verkade uttrycka betydligt mer ZIP4 än andra celler i samma område. Hos en del enterocyter sågs förutom gradienten viss brunaktig fingranulering i cytoplasman.



Figur 2. Uttryck av ZIP4 i duodenum hos kontrollhundarna C, D respektive E. 40x förstoring.

Även hos hunden med akrodermatit kunde ZIP4 påvisas. Även här sågs en gradient med kraftigare inmärkning apikalt (fig 3). Den totala infärgningen var dock blygsammare och det apikala uttrycket betydligt svagare och tunnare i jämförelse med samtliga hundar i kontrollgruppen.

Hos den sjuka hunden sågs den tydligaste och bredaste apikala infärgningen i kryptepitelet. Detta fynd överensstämmer inte med de teorier som Liuzzi et al presenterade 2004. Enligt Liuzzi et al skulle förändringar i lokalisering och apikal ackumulering av ZIP4 inte ske i tarmkryptornas omogna epitel.



Figur 3. Uttryck av ZIP4 i duodenum hos hunden med akrodermatit (A). 40x förstoring.

Hos samtliga hundar noterades alltså ett apikalt uttryck av ZIP4 i duodenum enterocyter precis som hos tidigare studerade djurslag. Att uttrycket hos kontrollhundarna var betydligt kraftigare än hos hunden med AE skulle kunna betyda att hundar med AE inte förmår uttrycka tillräckligt med ZIP4. Ett minskat uttryck skulle kunna tyda på minskad transkription av DNA, instabilt mRNA (med nedsatt translation som följd) eller på en störd glykosylering (som hindrar proteinet från att lämna ER). Dessa störningar skulle tillsammans eller var för sig kunna tyda på att genen som kodar för ZIP4 kan vara muterad. Letal akrodermatit skulle då kunna sägas vara hundens motsvarighet till acrodermatitis enteropathica.

Det går på grund av studiens blygsamma omfattning inte att säga huruvida skillnaden är signifikant eller ej. Det går heller inte att säga om det svagare uttrycket av ZIP4 förklaras av mutationer i genen *SLC39A4*, av ett högre zinkinnehåll i fodret eller av en normalvariation. Det torde dock inte vara fråga om en rasbunden variation, då två kontrollhundar av samma ras uttryckte betydligt mer ZIP4 än hunden med letal akrodermatit.

Genom sekvensering av cZIP4 skulle man kunna undersöka eventuella skillnader i aminosyrasekvens hos sjuka respektive friska individer. Om LAD-orsakande mutationer identifieras kan det bli möjligt att testa för dessa anlag i ett framtida avelsprogram.

Hud

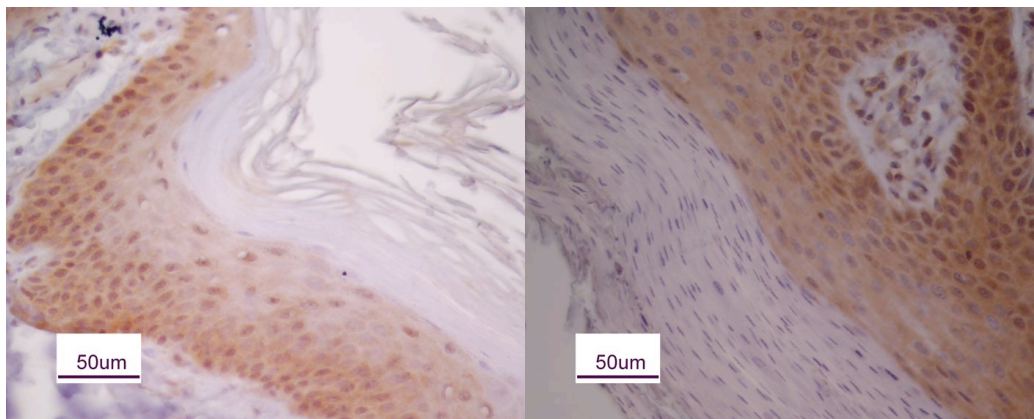
Huden hos hunden med akrodermatit jämfördes med huden hos en till kontrollgruppen hörande bullterrier. Båda hundarna uttryckte ZIP4 i epidermis, hårfolliklar, talgkörtlar, kärlendotel samt svettkörtelepitel.

Hårfolliklar

Infärgning sågs i hårfolliklarna hos båda hundarna. Inga skillnader kunde observeras hundarna emellan.

Epidermis

Okeratiniserade hudepitelceller färgades in (fig 4). Keratiniserade delar färgades inte in hos någon av hundarna. Den enda skillnaden hundarna emellan var den hyperkeratos och parakeratos som sågs hos hunden med akrodermatit. Dessa patologiska förändringar verkade inte påverka infärgningsgraden i epitelet.

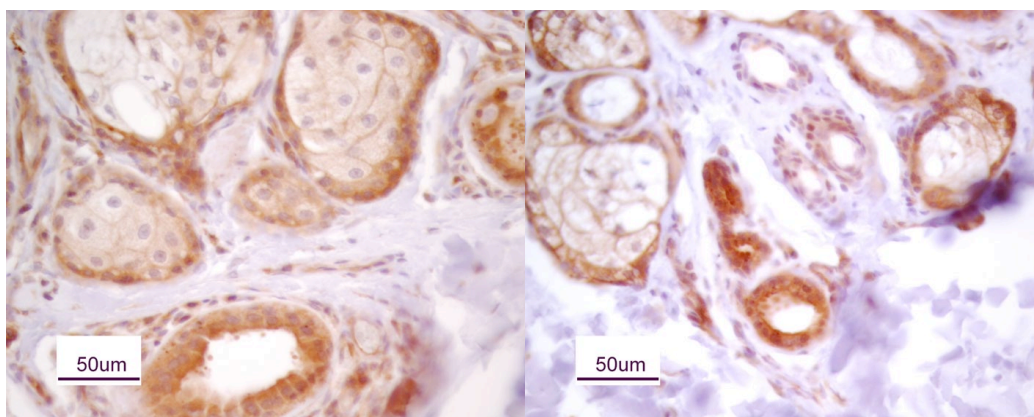


Figur 4. ZIP4-uttryck i epidermis keratiniserade delar hos hunden med akrodermatit A (t.v.) respektive kontrollhunden B (t.h.). Notera parakeratosen hos hunden med akrodermatit.

Ett något starkare uttryck sågs i de basala delarna av epidermis och i hårfolliklar. Epidermis och hårsäckar utgör strukturer med kraftig regeneration och tillräckliga zinknivåer är en grundförutsättning för normal celledelning och proteinsyntes. Att de basala cellagren uttrycker förhållandevis mer ZIP4 skulle kunna förklaras av den kraftiga mitosaktivitet som man kan förvänta sig där. Dessa celler borde på grund av sin lokalisering nära kärl och sin höga mitosaktivitet vara bäst lämpade att ta upp zink som transporterats till huden bundet till blodets albumin. Uttrycket av ZIP4 i basala celler bidrar sannolikt till att epidermis zinkupptag effektiviseras. Blodets zinknivåer varierar mycket lite. Om ZIP4 uttrycks i epidermis och hårfolliklar även vid normala zinkkoncentrationer i kroppen/blodet avspeglar detta sannolikt det stora zinkbehovet i den ständigt regnerande överhuden.

Talgkörtlar

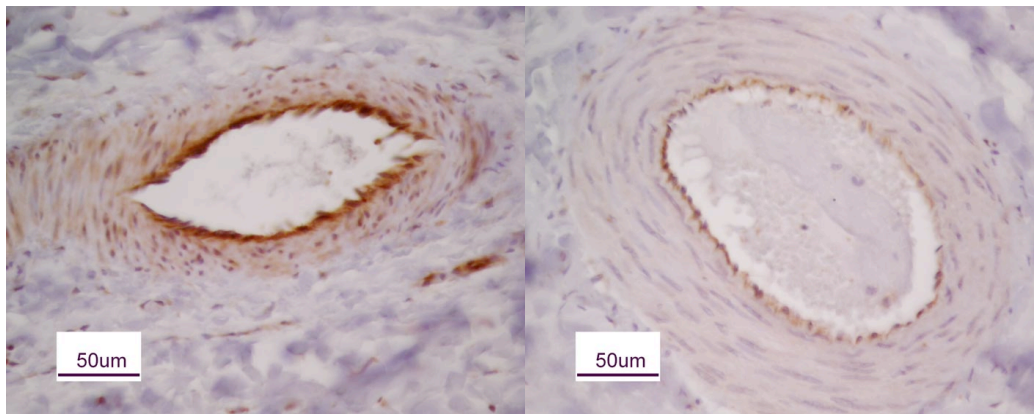
En svag, diffus, cytoplasmatisk infärgning sågs i talgkörtlarnas fettfyllda celler. En starkare infärgning noterades i det epitel som avgränsar varje acinus och som ger upphov till tidigare nämnda fettfyllda celler (fig 5). Inga skillnader kunde ses hundarna emellan.



Figur 5. ZIP4-inmärkning i talgkörtlar och svettkörtlar hos hunden med akrodermatit A (t.v.) respektive kontrollhunden B (t.h.). 40x förstoring.

Kärlendotel

Ett starkt uttryck av ZIP4 sågs i kärlendotelet (både arterioler och venulae) hos båda hundarna (fig 6). Uttrycket bedömdes som likvärdigt hos de båda hundarna.

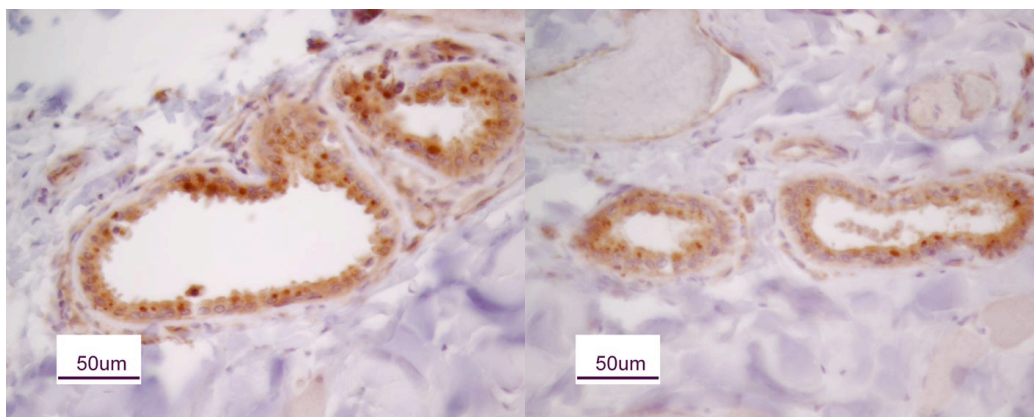


Figur 6. Uttryck av ZIP4 i kärlendotel hos hunden med akrodermatit A (t.v.) respektive kontrollhunden B (t.h.). 40x förstoring.

Svettkörtlar

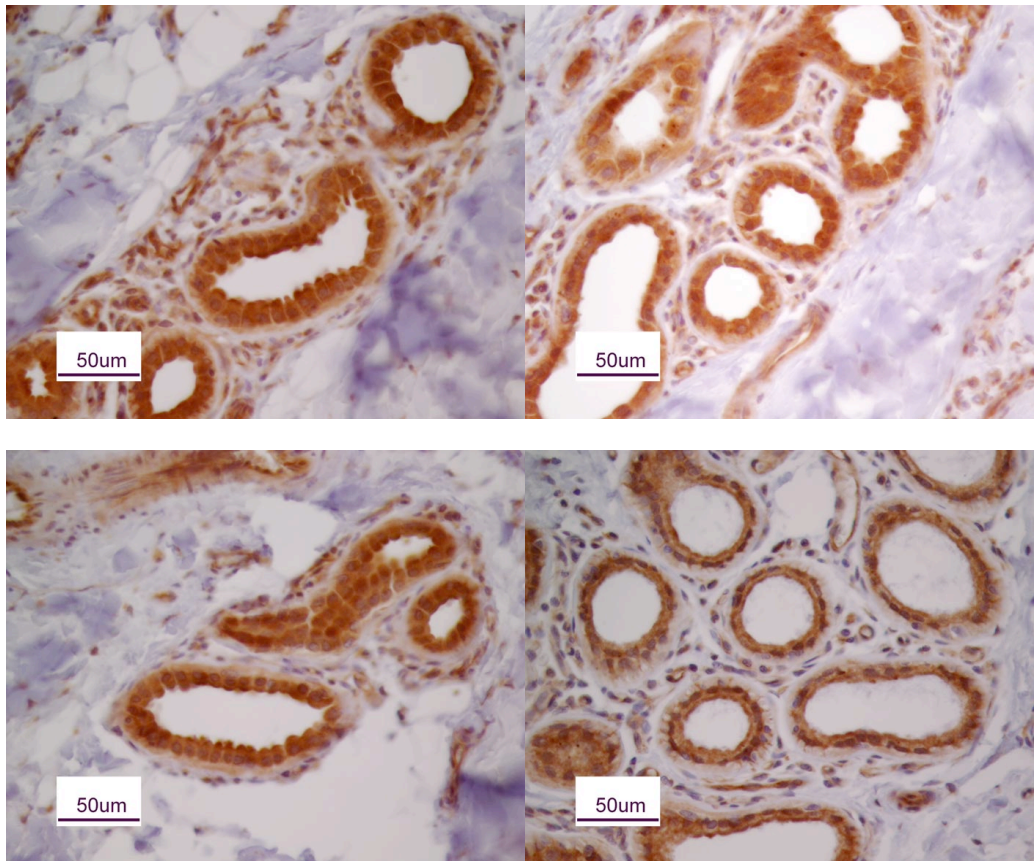
Den enda tydligt påvisbara skillnaden mellan hundarna sågs i svettkörtelepitelet. Kontrollhundens epitel präglades av stor heterogenitet medan hunden med akrodermatit uppvisade en mer homogen inmärkning. Hos akrodermatithunden sågs genomgående en ZIP4-ansamling apikalt i kombination med en svagare diffus inmärkning i övrig cytoplasma.

Hos den friska hunden varierade uttrycket från stora, bruna, välavgränsade granula i cellens centrala delar till en antydning till en gradient med ökad inmärkning apikalt (fig 7). Hos denna hund var gradienten otydligare och mer sporadiskt förekommande än hos hunden med akrodermatit.



Figur 7. ZIP4-inmärkning i kontrollhunden Bs svettkörtlar. 40x förstoring.

Någon variation i lokalisering noterades inte hos den sjuka hunden där infärgningen genomgående var klart kraftigast apikalt (fig 8). Hos hunden med akrodermatit var det apikala uttrycket snarare regel än undantag hos det studerade körtelepitelet.



Figur 8. ZIP4-inmärkning i svettkörtlar hos hunden med akrodermatit (A). 40x förstoring.

Det tycks alltså ske en upp- och nedreglering samt en omlokalisering av ZIP4 även i svettkörtlar. Det ligger nära till hands att fundera över om svettkörtlar kan ha en roll i hudens zinkhomeostas. Ett ökat apikalt uttryck av ZIP4 i huden hos en individ med zinkbrist skulle kunna motiveras av att cellerna försöker resorbera zinkjoner som annars skulle gå förlorade genom svettningar.

De bruna granula som sågs centralt i cytoplasman hos kontrollhunden skulle kunna motsvara ZIP4-reserver, antingen i form av nyttillverkat protein eller i form av återvunnet ZIP4 som genomgått endocytos och lagrats upp i vesikler. Vid tillräckliga zinknivåer i huden skulle det inte finnas något behov av resorption och därmed inget behov av apikalt ZIP4.

Uttrycket av ZIP4 i svettkörtlar verkar inte ha beskrivits i litteraturen tidigare. Det vore därför intressant med vidare studier för att utreda ovanstående hypoteser.

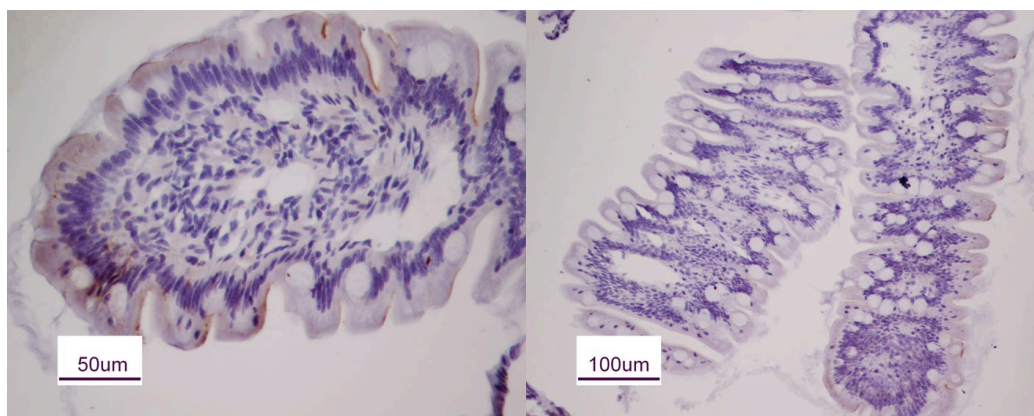
MT

Hundarna uttryckte metallothionein i magsäck (parietalceller), duodenum (enterocyter, bägarceller) och colon (enterocyter och bägarceller). Jejunum undersöktes ej. Enterocyterna uppvisade en diffus distribution av metallothionein i cytoplasman, vilket stämmer väl överens med tidigare data för andra djurslag.

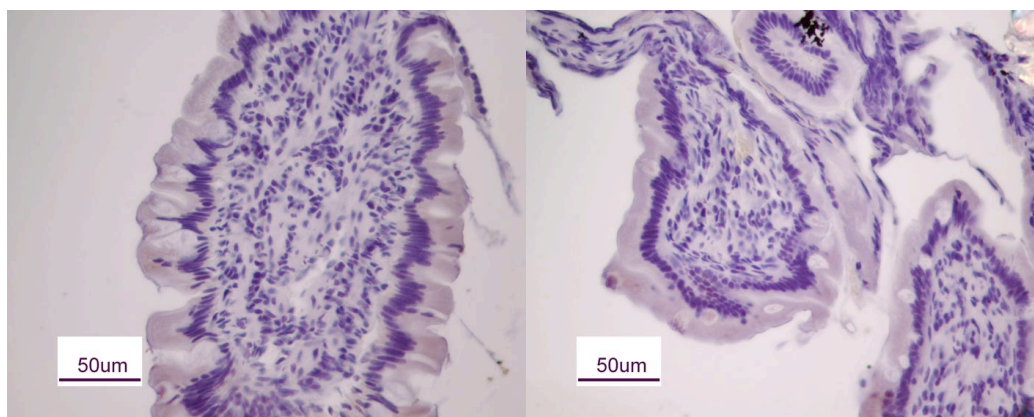
Metallothionein uttrycktes även i hudens svettkörtelepitel, hårfolliklar, talgkörtlar och epidermis.

Duodenum

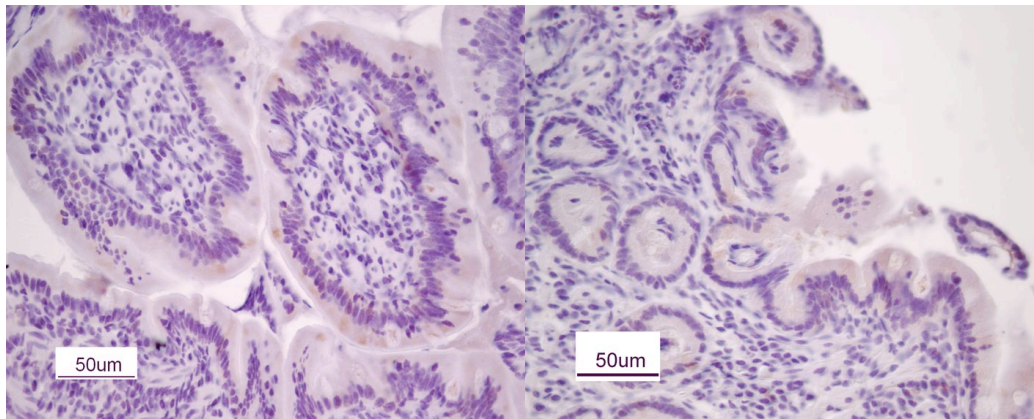
Uttrycket av metallothionein var hos kontrollhundarna framförallt koncentrerat till den apikala halvan av cellen. Enterocyternas infärgningsgrad i duodenum varierade. Hela spektrat från en mycket svag, diffus infärgning i cytoplasman till en tydligare, medelstark diffus inmärkning fanns representerat hos cellerna (fig 9-11). Vissa celler uppvisade sparsamt med små, bruna granula i sin apikala tredjedel, men viss spridning basalt om detta område sågs också. MT kunde påvisas i merparten av enterocyterna. På många håll sågs även en diffus infärgning i bägarceller.



Figur 9. MT-inmärkning hos kontrollhunden C (duodenum). 40x respektive 20x förstoring.

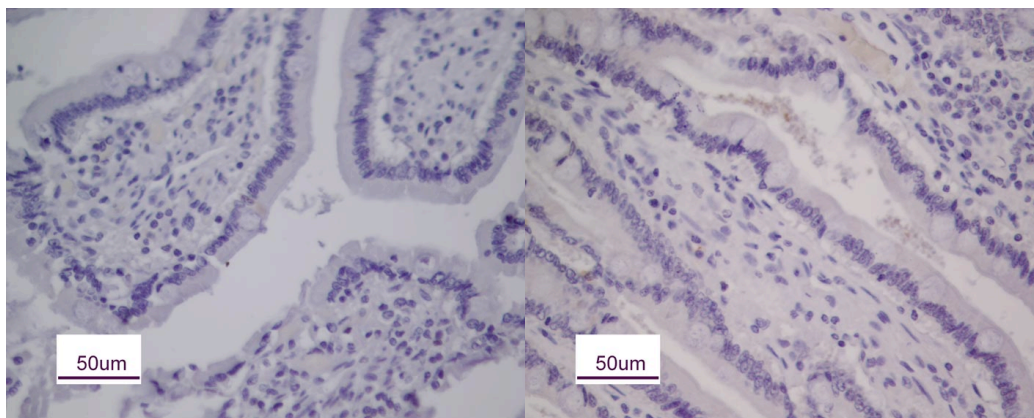


Figur 10. MT-inmärkning hos kontrollhunden D (duodenum). 40x förstoring.



Figur 11. MT-inmärkning hos kontrollhunden E (duodenum). 40x förstoring.

Hos AE-hunden sågs genomgående ett mycket lågt duodenalt uttryck av MT i jämförelse med kontrollhundarna (fig 12). Proteinet uttrycktes bara i ett mindre antal celler, i övrigt observeras ingen infärgning. En tänkbar förklaring till det låga uttrycket av MT är att hunden med akrodermatit har låga intracellulära zinknivåer på grund av sin störning och därför inte behöver uttrycka så mycket MT.



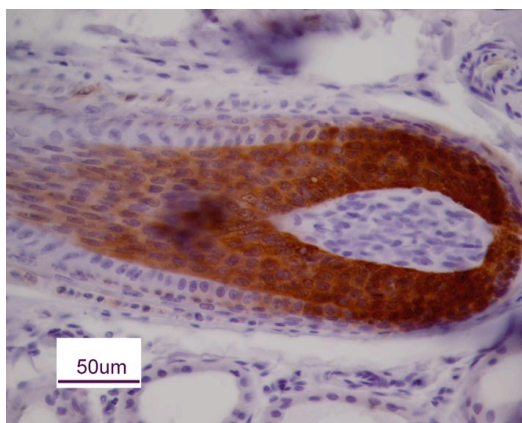
Figur 12. MT-inmärkning hos hunden med akrodermatit (A). 40x förstoring.

Hud

Hos båda hundarna sågs inmärkning i svettkörtelepitel, hårfolliklar, talgkörtlar och epidermis.

Hårfolliklar

Infärgning sågs generellt i hårfolliklarna (fig 13). Inga skillnader kunde påvisas hundarna emellan.



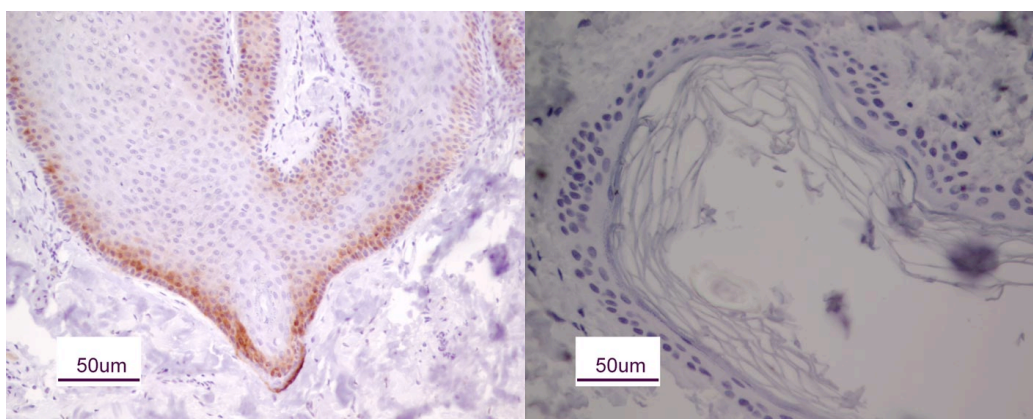
Figur 13. MT-inmärkning i hårfollikel hos hunden med akrodermatit (A). 40x förstoring.

Epidermis

Hos hunden med akrodermatit sågs en svag till medelstark infärgning i epidermis stratum basale (fig 14). I övriga kärnförande delar av epidermis syntes ingen till mycket svag inmärkning.

Hos kontrollhunden sågs ett varierande uttryck i epidermis. Vissa hudpartier uppvisade inga tecken på MT-uttryck (fig 14) medan det i andra syntes en svag, generell infärgning i epidermis kärnförande delar.

Keratiniserade delar saknade infärgning i båda fallen.

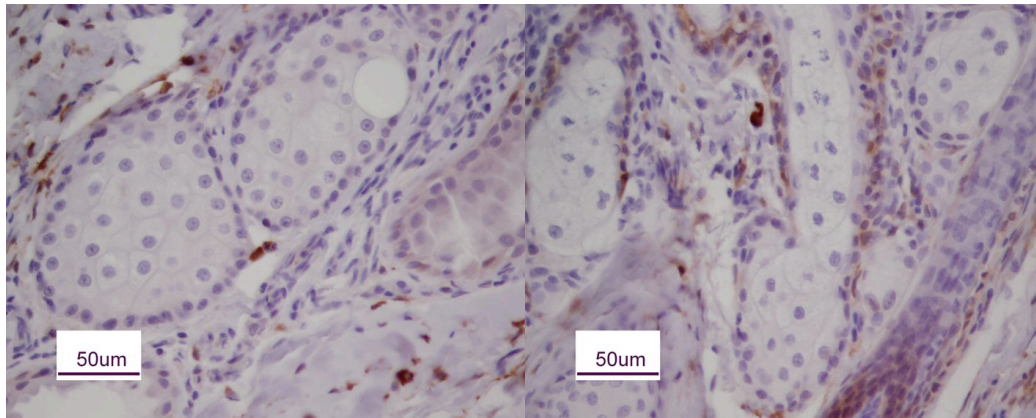


Figur 14. Tydlig basal MT-inmärkning hos hunden med akrodermatit A (t.v.). Ingen MT-inmärkning i epidermis hos kontrollhunden B (t.h.). 40x förstoring.

Det är svårt att dra några slutsatser om dessa skillnader utifrån två hundar. Det kraftigare, basala uttrycket av metallothionein hos hunden med akrodermatit skulle eventuellt kunna ha sin förklaring i den inflammation och kraftiga regeneration som hunden drabbats av. Inflammation är ett av de många stimuli som leder till uppreglering av MT. Dessutom borde en kraftig regeneration, såsom vid hyperkeratos, rimligtvis öka de basala keratinocyternas zinkbehov och därmed behovet av MT för reglering av intracellulära zinknivåer.

Talgkörtlar

Inga skillnader sågs mellan hundarna. Uttrycket varierade från obefintligt till medelstarkt i epitelet medan det var genomgående mycket svagt i de fettfyllda cellerna (fig 15). Infärgningen var i båda celltyperna diffus och cytoplasmatisk.



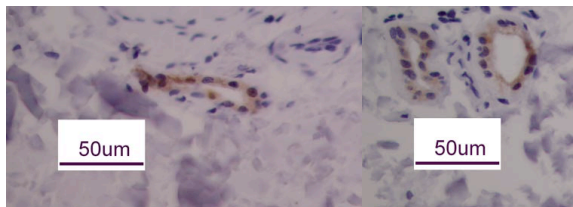
Figur 15. MT-inmärkning i talgkörtlar hos hunden med akrodermatit (A). 40x förstoring.

Kärlendotel

Ingen infärgning sågs hos hundarna.

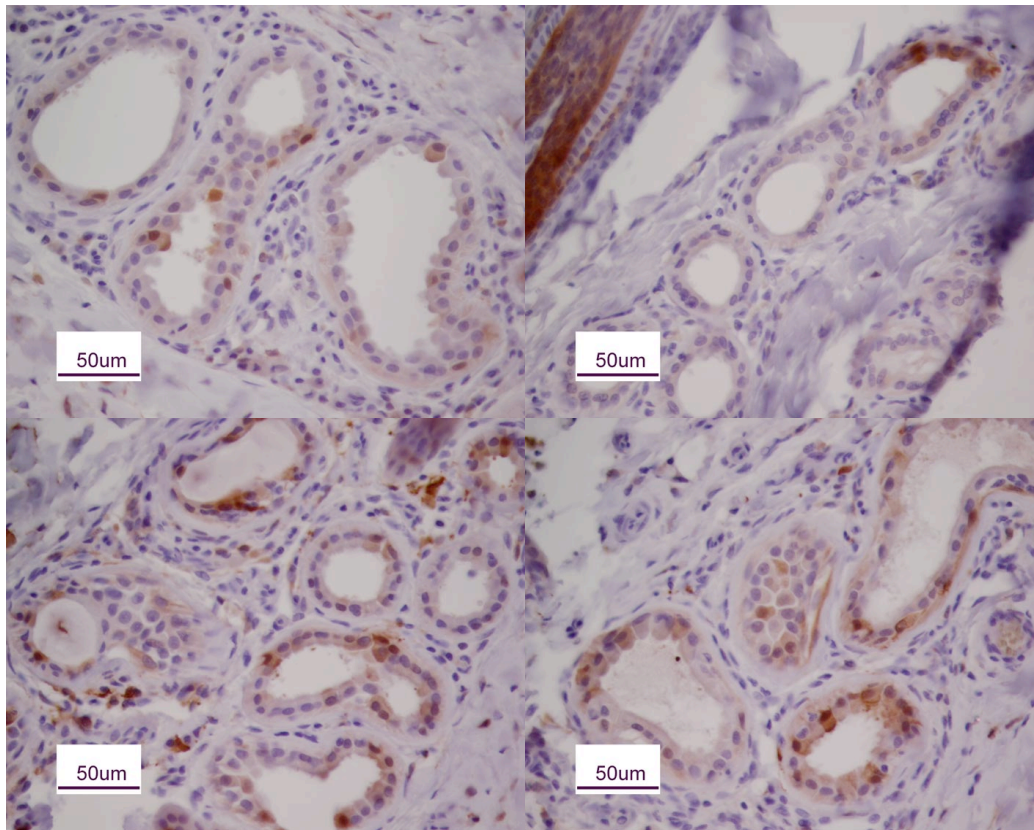
Svettkörtlar

Hos kontrollhunden sågs en svag till medelstark diffus infärgning i hela cytoplasman (fig 16).



Figur 16. MT-inmärkning i svettkörtelepitel hos kontrollhunden B. 40x förstoring.

Hos hunden med akrodermatit varierade infärgningen från mycket svag i vissa områden till starkare i andra (fig 17). I områden med starkare infärgning uppvisade cellerna en heterogen bild med varierande infärgningsgrad sinsemellan. Individuella celler kunde ha en jämn, cytoplasmatisk inmärkning, en mera fokal inmärkning vid det apikala membranet eller en inmärkning centralt i cytoplasman.



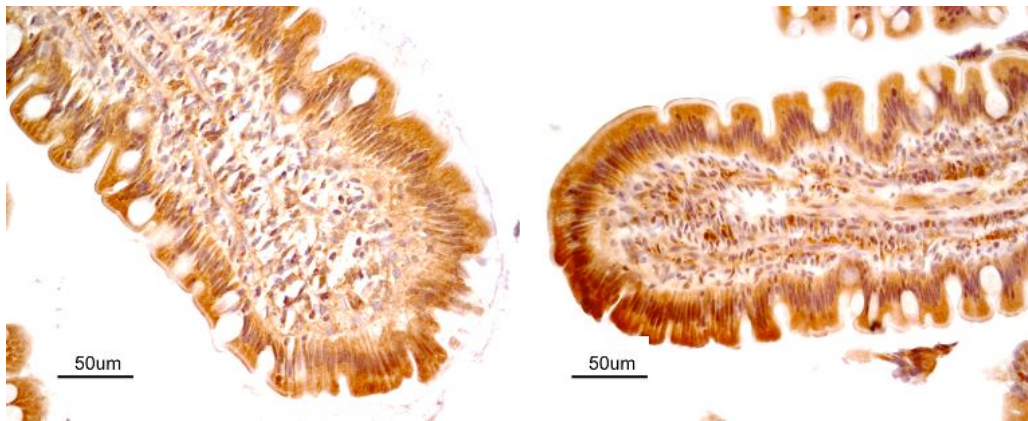
Figur 17. MT-inmärkning i svettkörtlar hos hunden med akrodermatit (A). 40x förstoring.

ZnT1

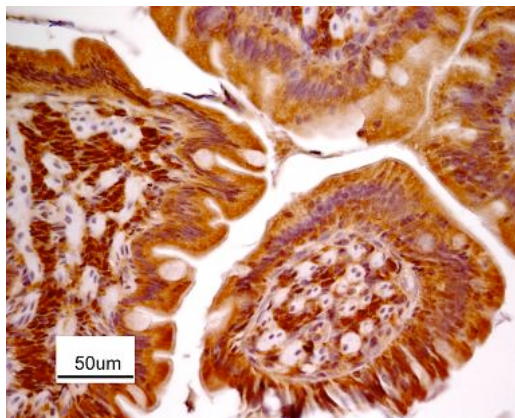
ZnT1-infärgning i enterocyter sågs i samtliga undersökta avsnitt av magtarmkanalen (ventrikel, duodenum, colon). Både likheter med och avvikelser från tidigare kända data observerades. Mer om detta nedan.

Duodenum

Hos kontrollhundarna (fig 18-19) sågs en generell, diffus infärgning i hela enterocytytoplasman. Infärgningen var måttlig med en kraftigare infärgning apikalt. Sällsynta exempel på en kraftigare lateral (men inte basolateral) infärgning förekom hos de tre kontrollhundarna C, D och E. Den apikala infärgningen var dock alltid kraftigast och mest påtaglig.

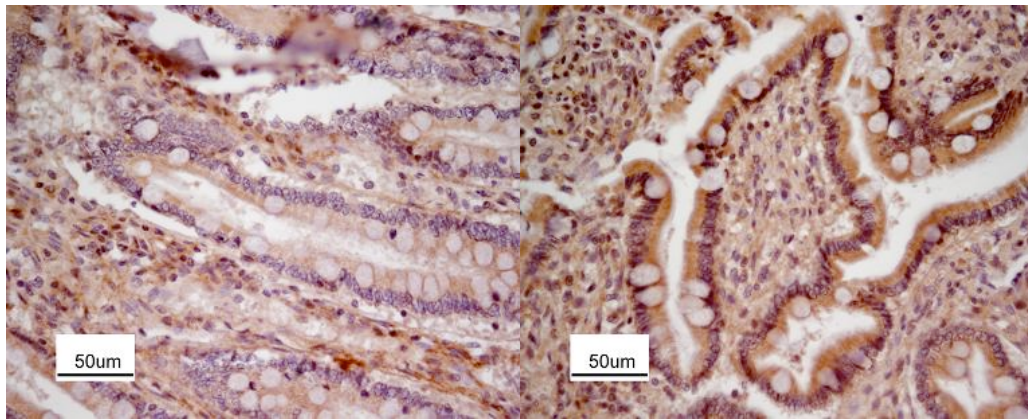


Figur 18. ZnT1-inmärkning i duodenums enterocyter hos kontrollhund C (t.v.) och D (t.h.). 40x förstoring.



Figur 19. ZnT1-inmärkning i duodenums enterocyter hos kontrollhund E. 40x förstoring.

Hunden med akrodermatit hade en liknande immunohistokemisk bild (fig 20). Infärgningen var även här generellt något starkare apikalt. Inga tecken på kraftig basolateral eller lateral infärgning noterades. Enterocyterna längst ut på villi hade en infärgningsgrad som var något svagare än kontrollgruppens. Den intracellulära lokaliseringen av proteinet var dock likvärdig mellan grupperna.



Figur 20. ZnT1-inmärkning i duodenum enterocyter hos hunden med akrodermatit (A). 40x förstoring.

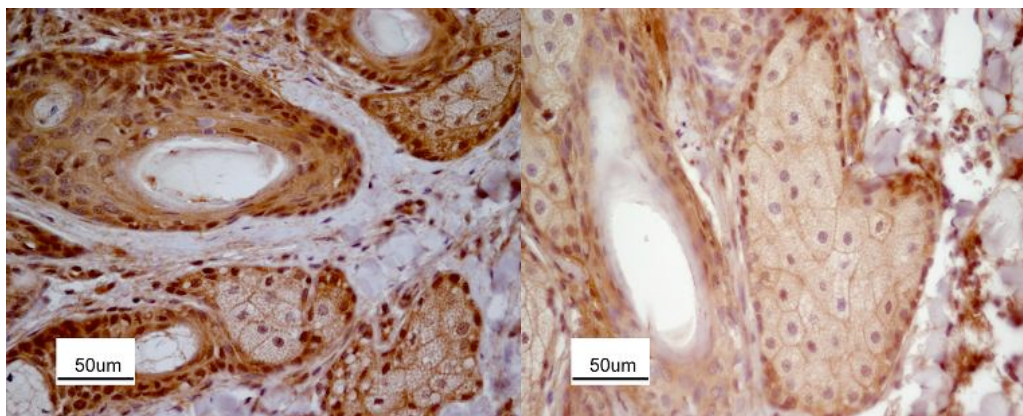
I anslutning till kryptorna var infärgningen generellt något svagare än längre upp på villi. Detta gällde för samtliga hundar. En tänkbar förklaring till detta är att kryptepitelets omogna enterocyter har ett lägre zinkinnehåll och en lägre zinkomsättning jämfört med de mer aktiva celler som ses längre upp på villi. Merparten av zinkjonerna absorberas längre upp på tarmvilli. Ett lägre zinkinnehåll och en lägre zinkomsättning i cellen borde rimligtvis kunna leda till en nedreglering av ZnT1.

I tidigare studier har man sett en basolateral ackumulering av ZnT1 i duodenala enterocyter hos råttor och mus (McMahon och Cousins, 2004; Yu et al, 2007). När man tittar närmare på McMahon och Cousins studie framgår dock av fotomaterialet att proteinet även uttrycks apikalt och i viss mån i cytosolen hos enterocyterna. Det apikala uttrycket ser i McMahon och Cousins studie ut att vara kraftigast på villitopparna. I studien utförd av Yu et al går det inte att dra några liknande slutsatser eftersom det inte framgår om bildernas enterocyter tillhör kryptepitelet eller villitoppsepitelet. Någon påtaglig apikal infärgning är inte synlig, vilket skulle kunna betyda att Yu et al fotograferat kryptepitelets enterocyter. Att uttrycket av ZnT1 inte är strikt begränsat till de basolaterala delarna tolkas som att enterocyterna inte enbart transporterar vidare upptaget zink så att det kan komma kroppen tillgodo, utan att en viss andel zinkjoner återförs till tarmlumen för eliminering.

Hud

Hårfolliklar

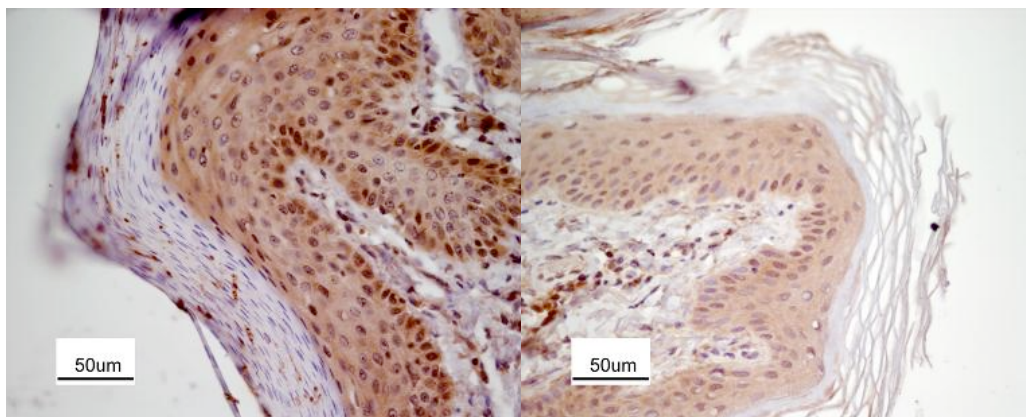
Infärgning sågs generellt i hårfolliklarna (fig 21). Inga skillnader kunde påvisas hundarna emellan.



Figur 21. ZnT1-inmärkning i hårfolliklar respektive talgkörtlar hos hunden med akrodermatit (A). 40x förstoring.

Epidermis

De kärnförande delarna av epidermis färgades in hos båda hundarna. Infärgningen var diffus och cytoplasmatisk. En kraftigare infärgning fanns i celler tillhörande stratum basale. Särskilt kraftig var denna infärgning hos hunden med LAD. Hos denna hund sågs dessutom en hyperkeratotisk parakeratos samt brunfärgade fragment i de keratiniserade delarna av epidermis. Fragmenten tolkades som rester av ZnT1-proteinet alternativt kärnrester. Kontrollhundens keratiniserade celler saknade sådana distinkta rester, men kunde ställvis skifta något i brunt (fig 22).



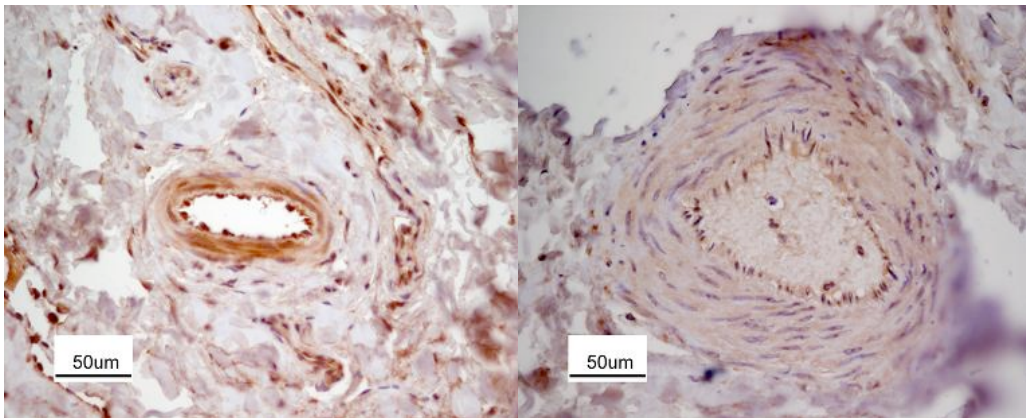
Figur 22. ZnT1-inmärkning i epidermis hos hunden med akrodermatit (A) t.v. och kontrollhunden (B) t.h. 40x förstoring.

Talgkörtlar

Inga skillnader påvisades hundarna emellan. En svag, diffus, cytoplasmatisk infärgning sågs i talgkörtlarnas fettfyllda celler. En starkare infärgning noterades i det epitel som avgränsar varje acinus och som ger upphov till tidigare nämnda fettfyllda celler (fig 21).

Kärlendotel

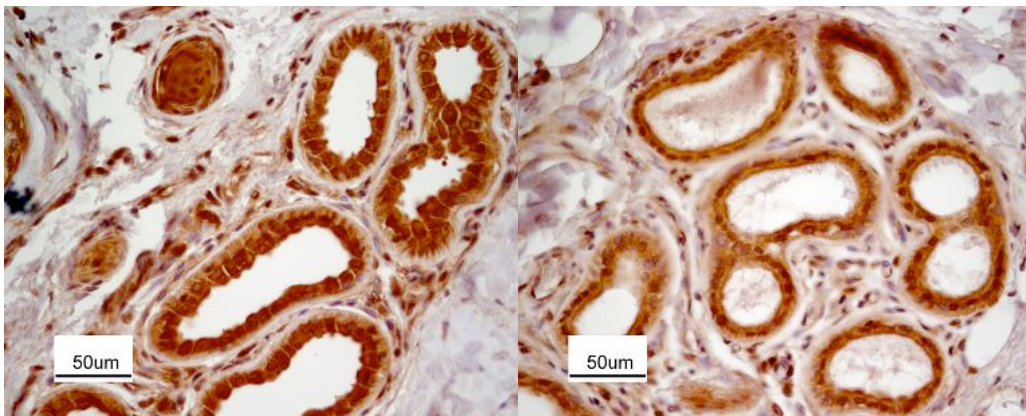
Kärlendotelet (arterioler och venulae) hade en generell, brun infärgning hos båda hundarna (fig 23).



Figur 23. ZnT1-inmärkning i kärlendotelet hos hunden med akrodermatit (A) t.v. och kontrollhunden (B) t.h. 40x förstoring.

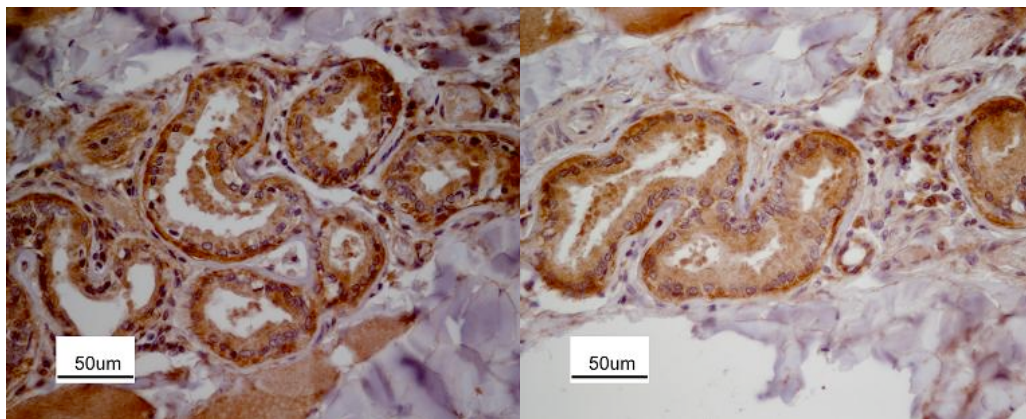
Svettkörtlar

Hos hunden med akrodermatit sågs en generell, diffus, cytoplasmatisk infärgning i svettkörtelepitelet. En kraftigare infärgning noterades apikalt mot lumen (fig 24). Överlag sågs en kraftigare infärgning hos hunden med akrodermatit.



Figur 24. ZnT1-inmärkning apikalt i svettkörtelepitelet hos hunden med akrodermatit (A). 40x förstoring.

Hos kontrollhunden sågs motsvarande generell, diffus, cytoplasmatisk infärgning. Kontrollhunden skilde sig från hunden med akrodermatit genom att ZnT1-ackumuleringen återfanns basalt (fig 25).



Figur 25. ZnT1-inmärkning basalt i svettkörtelepitelet hos kontrollhunden (B). 40x förstoring.

Ackumuleringen hade alltså olika lokalisering hos de båda hundarna. Innebär detta att cellerna i båda fallen är normalfungerande och att de helt enkelt förmår styra lokaliseringen av ZnT1 till det apikala respektive den basala cellmembranet beroende på kroppens aktuella zinkstatus? Eller lider hunden med akrodermatit av en störning som ger en felaktig lokalisering av proteinet?

En apikal lokalisering av proteinet bör leda till att zinkjoner transporteras ut i svetten i ductuli. Varför kroppen vid zinkbrist skulle sträva efter att öka zinkförlusten genom ökad utsöndring i svetten är ett mysterium. Hundar reglerar i låg utsträckning kroppstemperaturen genom svettningar. Därför verkar det orimligt att zinkbristen vid LAD primärt skulle bero på en kraftigt ökad förlust av zinkjoner via hudens svettkörtlar.

Den basala ackumuleringen av ZnT1 hos kontrollhunden är enklare att försöka förklara. Troligen är det så att kroppen hushåller med cellernas zinkreserver. En omfördelning av överskottszink från svettkörtelcellerna till andra delar av huden eller kroppen verkar praktisk och ekonomisk.

Denna varierande lokalisering samt dess orsak och verkan kräver vidare studier. Regleringen av proteinet kan vara komplex och det är inte osannolikt att upp- och nedreglering påverkas av andra faktorer än epitelcellernas aktuella zinkbehov.

När det gäller svettkörtelepitelets uttryck av ZnT1 (och ZIP4) finns stora kunskapsluckor. Det är inte omöjligt att man genom vidare studier inom detta område kan öka kunskapen om dermatiter, hudens lokala immunförsvar och sårhäkning.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2004. *Essential cell biology*. Second edition. Garland Science. 516-517.
- Andrews GK. 2001. *Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression*. *Biometals*. 2001 Sep-Dec;14(3-4):223-37. Review.
- Andrews GK. 2008. *Regulation and function of Zip4, the acrodermatitis enteropathica gene*. *Biochem Soc Trans*. 2008 Dec;36(Pt 6):1242-6. Review.
- Chimienti F, Aouffen M, Favier A, Seve M. 2003. *Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate*. *Curr Drug Targets*. 2003 May;4(4):323-38.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Roife AM. 2002. *Metallothionein: the multipurpose protein*. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Apr;59(4):627-47.
- Dalton TP, Bittel D, Andrews GK. 1997. *Reversible activation of mouse metal response element-binding transcription factor 1 DNA binding involves zinc interaction with the zinc finger domain*. *Mol Cell Biol*. 1997 May;17(5):2781-9.
- Davis SR, Cousins RJ. 2000. *Metallothionein Expression in Animals: A Physiological Perspective on Function*. *J Nutr*. 2000 May;130(5):1085-8.
- Dufner-Beattie J, Wang F, Kuo YM, Gitschier J, Eide D, Andrews GK. 2003. *The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice*. *J Biol Chem*. 2003 Aug 29;278(35):33474-81. Epub 2003 Jun 11.
- Hirano T, Murakami M, Fukada T, Nishida K, Yamasaki S, Suzuki T. 2008. *Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule*. *Adv Immunol*. 2008;97:149-76.
- Inoue K, Hirohisa Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Ichinose T, Sadakane K, Hiyoshi K, Sato M, Shimada A, Inoue M, Yoshikawa T. 2005. *Role of Metallothionein in Antigen-Related Airway Inflammation*. *Experimental Biology and Medicine* 230:75-81.
- Jezyk PF, Haskins ME, MacKay-Smith WE, Patterson DF. 1986. *Lethal acrodermatitis in bull terriers*. *J Am Vet Med Assoc*. 1986 Apr 15;188(8):833-9
- Kambe T, Andrews G. 2009. *Novel Proteolytic Processing of the Ectodomain of the Zinc Transporter ZIP4 (SLC39A4) during Zinc Deficiency Is Inhibited by Acrodermatitis Enteropathica Mutations*. *Molecular and cellular biology*. Vol. 29, No. 1.
- Kim BE, Wang F, Dufner-Beattie J, Andrews GK, Eide DJ, Petris MJ. 2004. *Zn²⁺-stimulated endocytosis of the mZIP4 zinc transporter regulates its location at the plasma membrane*. *J Biol Chem*. 2004 Feb 6;279(6):4523-30. Epub 2003 Nov 11.
- Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK. 2000. *The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene*. *J Biol Chem*. 2000 Nov 3;275(44):34803-9.
- Laity JH, Andrews GK. 2007. *Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1)*. *Arch Biochem Biophys*. 2007 Jul 15;463(2):201-10. Epub 2007 Apr 4.
- Lichten LA, Cousins RJ. 2009. *Mammalian Zinc Transporters: Nutritional and Physiologic Regulation*. *Annu. Rev. Nutr*. 2009. 29:153-76.
- Liuzzi JP, Bobo JA, Lichten LA, Samuelson DA, Cousins RJ. 2004. *Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 5;101(40):14355-60. Epub 2004 Sep 20.

- Liuzzi JP, Guo L, Chang SM, Cousins RJ. 2009. *Krüppel-like factor 4 regulates adaptive expression of the zinc transporter Zip4 in mouse small intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009 Mar;296(3):G517-23. Epub 2009 Jan 15.
- Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ. 2001. *Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats*. J Nutr. 2001 Jan;131(1):46-52.
- Mao X, Kim BE, Wang F, Eide DJ, Petris MJ. 2007. *A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity*. J Biol Chem. 2007 Mar 9;282(10):6992-7000. Epub 2007 Jan 3.
- Maverakis E, Fung MA, Lynch PJ, Draznin M, Michael D, Ruben B, Fazel N. 2007. *Acrodermatitis enteropathica and an overview of zinc metabolism*. J Am Acad Dermatol 2007;56:116-24.
- McEwan NA, Huang HP, Mellor DJ. 2003. *Immunoglobulin levels in Bull terriers suffering from lethal acrodermatitis*. Veterinary Immunology and Immunopathology 96 (2003) 235-238.
- McEwan NA, McNeil PE, Thompson H, McCandlish IA. 2000. *Diagnostic features, confirmation and disease progression in 28 cases of lethal acrodermatitis of bull terriers*. J Small Animal Pract. 2000 Nov;41(11):501-7.
- McMahon RJ, Cousins RJ. 1998. *Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Apr 28;95(9):4841-6.
- Naish SJ, Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH. 1989. *Handbook of immunochemical staining methods*. DAKO Corporation, Carpinteria, California.
- Prasad AS. 1985. *Clinical manifestations of zinc deficiency*. Annu Rev Nutr. 1985;5:341-63.
- Sato M, Kondoh M. 2002. *Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals*. Tohoku J Exp Med. 2002 Jan;196(1):9-22.
- Szczurek EI, Bjornsson CS, Taylor CG. 2001. *Dietary Zinc Deficiency and Repletion Modulate Metallothionein Immunolocalization and Concentration in Small Intestine and Liver of Rats 1,2*. J Nutr. 2001 Aug;131(8):2132-8.
- Uchida Y, Moon-Fannelli AA, Dodman NH, Clegg MS, Keen CL. 1997. *Serum concentrations of zinc and copper in bull terriers with lethal acrodermatitis and tail-chasing behaviour*. Am J Vet Res 1997 Aug;58(8):808-10.
- Wang K, Pugh EW, Griffen S, Doheny KF, Mostafa WS, al-Aboosi MM, el-Shanti H, Gitschier J. 2001. *Homozygosity mapping places the acrodermatitis enteropathica gene on chromosomal region 8q24.3*. Am. J. Hum. Genet. 68:1055-60.
- Wang K, Zhou B, Kuo Y, Zemansky J, Gitschier J. 2002 *A Novel Member of a Zinc Transporter Family Is Defective in Acrodermatitis Enteropathica*. Am. J. Hum. Genet. 71:66-73.
- Wang F, Kim BE, Dufner-Beattie J, Petris MJ, Andrews G, Eide DJ. 2004. *Acrodermatitis enteropathica mutations affect transport activity, localization and zinc-responsive trafficking of the mouse ZIP4 zinc transporter*. Hum Mol Genet. 2004 Mar 1;13(5):563-71. Epub 2004 Jan 6.
- Weaver BP, Dufner-Beattie J, Kambe T, Andrews GK. 2007. *Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5)*. Biol Chem. 2007 Dec;388(12):1301-12.

Yu YY, Kirschke CP, Huang L. 2007. *Immunohistochemical Analysis of ZnT1, 4, 5, 6, and 7 in the Mouse Gastrointestinal Tract*. J Histochem Cytochem. 2007 Mar;55(3):223-34.Epub 2006 Nov 13.

Tack

Till mina handledare Jonas Tallkvist och Fredrik Södersten, SLU.

Till Agneta Boström, SLU, för stöd och goda råd vid laboratoriearbetet.